



①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

①6 **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 197 16 154 A 1**

⑤1 Int. Cl.<sup>6</sup>:  
**A 61 K 38/17**  
A 61 K 31/70  
A 61 K 31/195

②1 Aktenzeichen: 197 16 154.5  
②2 Anmeldetag: 18. 4. 97  
④3 Offenlegungstag: 22. 10. 98

DE 197 16 154 A 1

⑦1 Anmelder:  
Boehringer Mannheim GmbH, 68305 Mannheim,  
DE

⑦2 Erfinder:  
Rödel, Wolfgang, Dipl.-Chem. Dr., 69123  
Heidelberg, DE; Mattern, Markus, Dr., 64646  
Heppenheim, DE; Winter, Gerhard, Dr., 69221  
Dossenheim, DE

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

⑤4 Stabile pharmazeutische Darreichungsform für Peptide, Proteine und Nukleinsäuren

⑤7 Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind lagerstabile lyophilisierte pharmazeutische Zubereitungen von Biomolekülen, wobei die Biomoleküle ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus Proteinen, Peptiden, Nukleinsäuren und Kohlehydraten, und ferner eine oder mehrere basische D- oder L-Aminosäuren und zusätzlich eine oder mehrere Aminodicarbonsäure, Hydroxycarbonsäure oder Dicarbonsäure oder deren physiologisch verträgliche Salze enthalten sind. Die Hilfsstoffe liegen im Lyophilisat zumindest teilweise in amorpher Form vor.

DE 197 16 154 A 1

Die Erfindung betrifft stabile lyophilisierte Zusammensetzungen für pharmazeutische oder diagnostische Zwecke, die ein Protein, ein Peptid, eine Nukleinsäure oder ein Polysaccharid enthalten, wobei die Hilfsstoffe derart ausgewählt sind, daß die Lyophilisate in amorpher oder teilmorpher Form vorliegen.

Die Fortschritte in der Biotechnologie in den letzten 20 Jahren führten zu einem immensen Anwachsen der Zahl von Biomolekülen, die in größeren Mengen verfügbar sind. Ein besonders aktives Feld für diese Produkte ist die Anwendung in pharmazeutischen Therapien. So werden zum Beispiel bestimmte Proteine zur Regulation einzelner Zelltypen eingesetzt, Nukleinsäuren zur Regulation der Genexpression, Polysaccharide zur Vakzinierung. In der klinischen Praxis ist es von Vorteil, wenn die Präparate bei Raumtemperatur gelagert werden können, da der Lagerraum zur Kühlung oftmals begrenzt ist.

Bei temperaturempfindlichen Präparaten ist zudem eine genaue Kontrolle der Lagerdauer zwischen Entnahme aus dem Kühlschrank und der Applikation (z. B. Injektion) notwendig, da sich durch Abbaureaktionen Nebenprodukte bilden können, die das Wirkungsspektrum verfälschen können. Insbesondere in der Routine im Krankenhaus sowie in umfangreicheren klinischen Studien am Menschen ist es schwierig, eine durchgehende Kontrolle der Lagerbedingungen der Präparate zu gewährleisten.

Sämtliche Biomoleküle können mehr oder weniger leicht hydrolysieren. Die Hydrolyse ist Bestandteil des natürlichen Metabolismus und z. B. erforderlich, um die Akkumulation höhermolekularer toxischer Substanzen im Körper zu verhindern.

In der Literatur ist zudem eine Vielzahl von weiteren Abbaureaktionen beschrieben, die für Biomoleküle in unterschiedlichem Maß zutreffen. Im Fall von Peptiden oder Proteinen erfolgen derartige Abbaureaktion durch Aggregation, Denaturierung, Isomerisierung oder Redoxvorgänge. Im Fall von Nukleinsäuren führen beispielsweise Desaminierung oder Addition eines Nukleophils zum Abbau der Nukleinsäuren.

Bei der Entwicklung von stabilen Lyophilisaten, wie z. B. von pharmazeutischen oder diagnostischen Zubereitungen von Peptiden oder Proteinen, gibt es noch keine gesicherten kausalen Methoden, die es gestatten würden, aus der Vielzahl der möglichen Hilfs- und Zusatzstoffe diejenigen Hilfsstoffe zuverlässig auszuwählen, die eine stabile Darreichungsform des jeweiligen Wirkstoffes gewährleisten. Die Auswahl geeigneter Hilfsstoffe zur Erzielung einer hinreichend stabilen Darreichungsform, die beispielsweise eine hinreichend lange Lagerstabilität gewährleisten oder die die oben genannten Abbaureaktionen verzögern oder verhindern, geschieht meist empirisch.

Es ist bekannt, daß die Lagerstabilität vieler Proteinpräparate durch Entzug des Wassers erhöht wird. Geeignete Methoden hierzu sind Gefriertrocknung und Vakuumtrocknung. Die Anwendung solcher technischer Prozesse kann jedoch ebenfalls Abbaureaktionen hervorrufen, z. B. ist in der Gefriertrocknung eine Einfrierphase notwendig. Allerdings sind viele Proteine nicht hinreichend stabil gegen Einfrierprozesse. Beim Abkühlen der wäßrigen Lösung eines Biopolymers kristallisiert der überwiegende Teil des Wassers aus, während das Biopolymer in amorphem Zustand verbleibt. Dadurch kann es zu einer Veränderung der molekularen Umgebung des Biopolymers kommen, wodurch sich auch die räumliche Struktur bzw. Konformation des Biopolymers selbst ändern kann. Dies wiederum kann Abbaureaktionen begünstigen, indem beispielsweise die Reaktivität einzelner funktioneller Gruppen zunimmt oder aufgefaltete Kettensegmente benachbarter Polymere aggregieren. Ebenso kann in der Trocknungsphase der Entzug der das Protein umgebenden Hydrathülle chemische Reaktionen wie Oxidation in der Proteinkette zur Folge haben. Durch den Zusatz von geeigneten Zusatzstoffen können diese Abbaureaktionen vermieden oder zumindest im Ausmaß verringert werden.

Bei der Gefriertrocknung oder Vakuumtrocknung besteht die Funktion der Hilfsstoffe im wesentlichen darin, eine stabilisierende amorphe Umgebung für das Biopolymer zu schaffen, die bei weiterer Abkühlung im Glaszustand erstarrt. Der Übergang geschieht sprunghaft innerhalb eines sehr engen Temperaturintervalls und läßt sich durch die Glasübergangstemperatur  $T_g$  charakterisieren. Unterhalb dieser Temperatur ist die molekulare Beweglichkeit und damit auch die Reaktivität stark herabgesetzt. In einer für die Gefriertrocknung gut geeigneten Rezeptur liegt  $T_g$  möglichst hoch, typischerweise oberhalb von  $-40^\circ\text{C}$ .

Um hinreichend stabile lyophilisierte pharmazeutische Darreichungsformen herstellen zu können, ist es erforderlich, nur solche Hilfsstoffe auszuwählen, die während des Einfrierens nicht oder höchstens teilweise auskristallisieren. Derartige Hilfsstoffe werden auch als "Cryoprotectants" bezeichnet. In der Haupttrocknungsphase sublimieren die Eiskristalle, während in der Nachtrocknungsphase ein Teil des in der amorphen Phase und im Biopolymer gebundenen Wassers abgezogen wird, was in der Regel drastischere Bedingungen erfordert (höhere Temperatur oder stärkeres Vakuum). Mit der Abnahme des Wassergehalts im Gefriertrocknungsgut steigt  $T_g$ . Um die Zeit für den Trocknungsprozeß zu verkürzen, wird die Temperatur der Platten der Gefriertrocknungs-Kammer sukzessive erhöht, die Temperatur im Gefriertrocknungsgut darf  $T_g$  jedoch nie überschreiten.

In der Trocknungsphase bewirken die Hilfsstoffe die Aufrechterhaltung des Glaszustandes, in den das Polymer eingebettet ist. In der Nachtrocknungsphase entstehen zudem durch Entzug von Wassermolekülen im Biopolymer freie Valenzen für Wasserstoffbrückenbindungen. Auch hierdurch erhöht sich die Reaktivität des Biopolymers. Durch den Zusatz von geeigneten stabilisierend wirkenden Hilfsstoffen soll die Ausbildung von Wasserstoffbrücken bewirkt werden, die für das Biopolymer eine Umgebung aus Wasserersatz zu schaffen. Hierfür wurde der Begriff "Lyoprotectants" geprägt.

Die Obergrenze für die Temperaturbelastung beim Lagern wird durch die Glasübergangstemperatur  $T_g$  bestimmt, oberhalb derer die molekulare Beweglichkeit stark zunimmt. Als Folge dessen treten oft Kristallisationsprozesse (beschrieben durch die Kristallisationstemperatur  $T_k$ ) oder chemische Reaktionen auf. Makroskopisch gesehen kommt es dabei oft zum sog. Kollaps des Lyophilisatkuchens (beschrieben durch die Kollapstemperatur  $T_c$ ), da die Hilfsstoffmoleküle untereinander assoziieren, was von einer Verringerung der spezifischen Oberfläche der Hilfsstoffmatrix begleitet wird.

Das im Lyophilisat vorhandene Wasser senkt  $T_g$ , in einer guten Rezeptur liegt die Restfeuchte nach Gefriertrocknung unter 3%. Im Laufe längerer Lagerung kann sie allerdings etwas ansteigen. Um einen genügenden Sicherheitsabstand zu haben, sollte die Lagertemperatur des Lyophilisates im Glaszustand maximal  $20^\circ\text{C}$  unterhalb von  $T_g$  liegen.

WO 93/00807 beschreibt ein Zweikomponentensystem, bestehend aus einem Cryoprotectant (wie Polyethylenglykol, PVP oder Stärke) und einem Lyoprotectant (wie Zucker, Polyhydroxyalkohol oder Aminosäure) zur Stabilisierung während der Lyophilisation.

Nach Levine und Slade steigt die Tendenz zur Glasbildung mit dem Molekulargewicht. Zur Bildung stabiler Glasmatrices werden daher Polymere wie PVP, Proteine (insbesondere Serumalbumin) oder Polysaccharide (Dextran) eingesetzt.

Es ist jedoch bekannt, daß Schutzproteine wie Serumalbumin nach Injektion nachteilig sein können, da sie die Bildung von Antikörpern hervorrufen können, was den Einsatz für parenterale Präparate beeinträchtigt. Zudem ist Chargenkonsistenz oft schwer zu gewährleisten. Weiterhin können Unterschiede in den Rohstoffchargen der Schutzproteine Unsicherheiten mit sich bringen, da hierdurch die Prozeßfähigkeit und die Qualität der resultierenden Produktchargen negativ beeinflußt werden kann.

Die als Hilfsstoffe eingesetzten Polysaccharide können im Blutkreislauf darüberhinaus pyrogen wirken. Außerdem haben Polysaccharide den Nachteil, daß sie oft ein Anquellen erfordern, so daß sie bei der Rekonstitution eines Lyophilisats die schnelle Bildung einer klaren Lösung behindern. Außerdem besteht das Material in der Regel aus einer Fraktion mit unterschiedlichen Kettenlängen, was die Chargenkonsistenz erschwert. Letzteres gilt auch für synthetische Polymere wie PVP.

Als niedermolekulare Substanzen zur Glasbildung in Lyophilisaten für Biomoleküle werden bisher fast ausschließlich Polyhydroxyverbindungen wie Saccharide (Saccharose, Trehalose, Glucose) oder Zuckeralkohole (Mannit) verwendet. Reduzierende Zucker wie Glucose oder Maltose können Radikal- oder Redoxreaktionen verursachen, aber auch mit primären Aminogruppen (z. B. in Proteinen) Amadori-Produkte bilden. Zusätzlich kann sich das Präparat durch die Maillard-Reaktion bräunlich verfärben. Nichtreduzierende Di- oder Trisaccharide können hydrolysieren, wobei sich einerseits reduzierende Zucker bilden können, andererseits werden möglicherweise die physikalischen Eigenschaften der Hilfsstoffmatrix beeinträchtigt. Von Zuckeralkoholen wie Mannit ist bekannt, daß sie z. B. in Gegenwart von Acetat Hydrolysereaktionen katalysieren. Zudem neigen sie zum Auskristallisieren. Dennoch wird häufig die Kombination Mannit/Glycin/(evtl. Phosphat, Detergens) als Hilfsstoffmatrix zur Lyophilisation von Proteinen eingesetzt (vgl. EP 0 597 101, WO 89/09614).

Zur Lyophilisation wird in der Regel auch eine weitere Verbindung (z. B. Saccharose) zugesetzt werden, um eine glasartige Matrix zu erhalten. Der Zusatz von Mannit oder Glycin als sog. "bulking agents" ergibt nur metastabile Glaszustände, die bei Lagerung nachkristallisieren können.

Überraschenderweise wurde gefunden, daß bestimmte Kombinationen von Hilfsstoffen als Glasbildner bei der Lyophilisation von Biomolekülen geeignet sind. Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind daher lyophilisierte Zubereitungen enthaltend a) Biomoleküle ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Proteinen, Peptiden, Nukleinsäuren und Kohlehydraten, b) eine oder mehrere basische D- oder L-Aminosäure und c) eine oder mehrere Aminodicarbonsäure, Hydroxycarbonsäure, Hydroxydicarbonsäure oder Dicarbonsäure, oder deren physiologisch verträgliche Salze, wobei die Hilfsstoffe im Lyophilisat zumindest teilweise in amorpher Form vorliegen.

Die Auswahl der Hilfsstoffe führt dazu, daß die Hilfsstoffe in den Lyophilisaten entweder vollkommen amorph oder zumindest in teilmorpher Modifikation vorliegen. Derartige Lyophilisate weisen im Gegensatz zu kristallinen Zusammensetzungen eine Glasübergangstemperatur ( $T_g$ ) auf. Geeignete Kombinationen von Hilfsstoffen sind Mischungen enthaltend mindestens je eine Substanz aus den Gruppen (A) und (B), wobei (A) eine basische D- oder L-Aminosäure ist, und (B) eine Aminodicarbonsäure, insbesondere eine saure D- oder L-Aminosäure; Aminocarbonsäure; Monocarbonsäure; Dicarbonsäure oder Hydroxydicarbonsäure ist, oder deren physiologisch verträglichen Salze. Derartige Mischungen eignen sich als Glasbildner bei der Lyophilisation von Biomolekülen und haben dadurch den Vorteil, daß die so hergestellten Lyophilisate über einen längeren Zeitraum (vorzugsweise mindestens ein Jahr, insbesondere 1-2 Jahre bei Kühlschranktemperatur oder Raumtemperatur) hinweg stabil sind. Dies ermöglicht die Reduzierung oder die völlige Vermeidung der oben erwähnten weniger geeigneten Substanzgruppen, so daß die Nachteile bei der Verwendung der genannten Substanzgruppen bei der Herstellung von pharmazeutischen Darreichungsformen weitgehend vermieden werden können.

Pharmazeutisch stabile Lyophilisate können dann erhalten werden, wenn das Paar aus der basischen Aminosäure und dem zur pH-Einstellung notwendigem Gegenion so gewählt wird, daß bei der Lyophilisation eine Matrix entsteht, die mindestens teilweise amorph ist und eine Glasübergangstemperatur von mehr als 50°C, vorzugsweise mehr als 65°C, insbesondere mehr als 80°C aufweist. Für das Herstellungsverfahren ist von Vorteil, wenn die gefrorene Lösung eine Glasübergangstemperatur von mehr als -40°C aufweist.

Zur Einstellung des pH-Wertes können ferner physiologisch verträgliche Säuren oder Basen sowie deren Salze eingesetzt werden. Geeignete Säuren sind anorganische oder organische Säuren, wie beispielsweise Phosphorsäure, Essigsäure, etc. Vorzugsweise werden freie Säuren oder Basen eingesetzt, um eine möglichst niedrige Salzkonzentration im Lyophilisat zu erreichen. Zur Einstellung eines pH im Bereich 5-7 bei Verwendung einer basischen Aminosäure wird vorzugsweise Phosphorsäure als anorganische Säure eingesetzt. Mit einigen Peptiden und Proteinen wurde in Arginin-Phosphat die Bildung von Protein-Aggregaten bei der Herstellung der zu lyophilisierenden Lösung beobachtet, sofern der Phosphatgehalt höher als 5 mM lag. Ähnliches Verhalten wurde bei Verwendung von Arginin-Citrat festgestellt. Überraschenderweise kann die Bildung von Aggregaten reduziert oder weitgehend vermieden werden, wenn anstelle des Phosphatsalzes der Aminosäure Arginin als Gegenion Mono- oder Dicarbonsäuren eingesetzt werden. Lyophilisate mit stabilem Glaszustand wurden insbesondere dann erhalten, wenn Aminodicarbonsäuren (z. B. saure D- oder L-Aminosäuren) oder Dicarbonsäuren eingesetzt werden.

Darüberhinaus weisen die erfindungsgemäßen Darreichungsformen den weiteren Vorteil auf, daß die Glasübergangstemperatur wie auch das Erscheinungsbild des Lyophilisatkuchens weiter verbessert wurde, insbesondere dann, wenn zusätzlich eine neutrale Aminosäure zugegeben wurde, selbst wenn diese teilweise auskristallisiert. Die Menge kann dabei in weiten Grenzen variiert werden (5-50% der gesamten Hilfsstoffmenge).

Die erfindungsgemäßen Darreichungsformen haben den Vorteil, daß sie über längere Zeit bei Raumtemperatur lager-

stabil sind. Damit ist auch bei Unterbrechung der Kühlkette die sichere Anwendung als Arzneimittel gewährleistet.

Als geeignete Zusatz- oder Hilfsstoffe im Sinne der vorliegenden Erfindung kommen als bevorzugte Ausführungsform eine Kombination aus einer basischen, einer sauren und mindestens einer neutralen Aminosäure in Frage. Diese Kombinationen sind physiologisch gut verträglich, besitzen gute Gefriertrocknungseigenschaften und verbessern die thermische Stabilität lyophilisierter Biopolymere. Außerdem führt das Auflösen des Lyophilisats mit Wasser schnell zu einer klaren Lösung.

Die Menge der erfindungsgemäßen Zusatzstoffe werden bevorzugt derart ausgewählt, daß das Gewichtsverhältnis der in Gruppe c) genannten Säuren (Aminodicarbonsäuren, Hydroxycarbonsäuren oder Dicarbonsäuren) zu den basischen D- oder L-Aminosäuren der Gruppe a) im Lyophilisat im Bereich von 0,01 : 1 bis 2 : 1 beträgt. Besonders vorteilhaft ist ein Bereich von 0,1 : 1 bis 1 : 1, insbesondere etwa 0,5 : 1.

Im Sinne der vorliegenden Erfindung kommen zahlreiche Peptide oder Proteine als Wirkstoffe zur Herstellung der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Darreichungsformen in Frage, wie z. B. Immunmodulatoren, Lymphokine, Monokine, Cytokine, Enzyme, Antikörper, Wachstumsfaktoren, wachstumshemmende Faktoren, Blutproteine, Hormone, Vakzine, Blutkoagulationsfaktoren, sowie entsprechende Vorläuferproteine, Muteine oder Fragmente hiervon. Die Peptide oder Proteine besitzen ein Molekulargewicht von 1 D–100 000 D, bevorzugt mindestens 5 D, 10 D, 20 D bis zu 50 D oder 75 D. Beispielfhaft seien folgende Peptide oder Proteine genannt: Atrial natriuretischer Faktor bzw. ANP (s.a. WO 85/33768), Urodilatin bzw. Ularitide (s.a. WO 88/06596, WO 95/33768), Cardiodilatin (s.a. WO 85/02850), BNP (brain natriuretic peptides), Auriculin, Interferone, Kolonie-stimulierende Faktoren, Interleukine (IL-1, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, etc.) Makrophagen aktivierende Faktoren, B-Zell Faktoren, Urokinase, Plasminogenaktivatoren, TNF, NGF, Erythropoietin, EGF, hGH, BMP (bone morphogenic proteins), Calcitonin, Insulin oder Relaxin.

Auch Nukleinsäuren wie Plasmide, DNA-Fragmente oder RNA-Stränge eignen sich für die erfindungsgemäßen Darreichungsform.

#### Beispiel 1

Rezeptur 1	Konzentration der Ausgangslösung
L-Arginin	20 mg/ml
Asparaginsäure	10 mg/ml
Tween 80	0,1 mg/ml
G-CSF	0,35 mg/ml

Der pH-Wert der Lösung wird mit H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> auf pH 7,4 eingestellt. Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf die Lösung vor der Lyophilisation.

2 g L-Arginin und 1 g L-Aspartat wurden in 50 ml Wasser gelöst und durch Zugabe von Phosphorsäure ein pH von 7,8 eingestellt. Zu dieser Lösung wurden 35 mg G-CSF (gelöst in 30 ml 100 mM Phosphat-Puffer) zupipettiert und 5 min. gerührt. Anschließend wurden 10 ml Tween 80 (als 10% wäßrige Lösung zupipettiert und weitere 20 min. gerührt. Der pH wurde durch Zugabe von Phosphorsäure auf 7,4 eingestellt und das Volumen auf 100 ml aufgefüllt. Diese Lösung wurde membranfiltriert (PVDF-Filter 0,2  $\mu$ m) und jeweils 1 ml in Glasvials abgefüllt. Nach Aufsetzen eines geeigneten Stopfens wurde eine Gefriertrocknung durchgeführt, wobei die Trocknung über einen Zeitraum von insgesamt 40 Stunden erfolgt. Die vials wurden anschließend verschlossen und bis zur Analyse bei unterschiedlichen Temperaturen gelagert. Mit DSC wurde festgestellt, daß die Glasübergangstemperatur des Kuchens bei 99°C liegt. Nach 26 Wochen wurden von unterschiedlich gelagerten Proben dieses Lyophilisats Röntgenbeugungsspektren aufgenommen. Diese zeigen, daß es auch nach Lagerung bei einer Temperatur von +60°C vollamorph ist

#### Beispiel 2 (Vergleichsbeispiel)

Rezeptur 2	Konzentration der Ausgangslösung
L-Valin	20 mg/ml
Glycin	20 mg/ml
Tween 80	0,1 mg/ml
G-CSF	0,35 mg/ml

Der pH-Wert der Lösung wird mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt.

2 g L-Valin und 2 g Glycin wurden in 50 ml Wasser gelöst, 10 ml Tween 80 (als 10% wäßrige Lösung) zupipettiert und 20 min. gerührt. Anschließend wurde der pH durch Zugabe von NaOH auf 7,4 eingestellt. Zu dieser Lösung wurden 35 mg G-CSF (gelöst in 30 ml 100 mM Phosphat-Puffer) zupipettiert und 5 min. gerührt. Der pH wurde kontrolliert und das Volumen auf 100 ml aufgefüllt. Von dieser Lösung wurde nach Abfüllung in vials ein Lyophilisat wie unter Beispiel 1 hergestellt. Im DSC dieses Lyophilisats unmittelbar nach Herstellung war kein Glasübergang zu erkennen. Anhand von Röntgenbeugungsspektren und Aufnahmen im Rasterelektronenmikroskop war zu erkennen, daß der Kuchen vollkristallin ist. Es sind keine amorphen oder teilamorphe Strukturen nachweisbar.



Rezeptur 3	Konzentration der Ausgangslösung
L-Valin	20 mg/ml
Glycin	20 mg/ml
Tween 80	0,1 mg/ml
LDH	(150 U <sup>25 °C</sup> ) 0,5 mg

Der pH-Wert der Lösung wird mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt.

2 g L-Valin und 2 g Glycin wurden in 70 ml Wasser gelöst und 20 min. gerührt. Anschließend wurde der pH durch Zugabe von NaOH auf 7,0 eingestellt. Zu dieser Lösung wurden 50 mg (15 kU) LDH (aus Schweinemuskel, gelöst in 20 ml 100 mM Phosphat-Puffer) zupipettiert und 5 min. gerührt. Der pH wurde kontrolliert und das Volumen auf 100 ml aufgefüllt. Von dieser Lösung wurde nach Abfüllung in Vials ein Lyophilisat wie unter Beispiel 1 hergestellt. Diese Rezeptur ist ebenfalls vollkristallin. Es sind keine amorphen Strukturen nachweisbar.

#### Beispiel 4

Rezeptur 4	Mengeninhalt pro vial
L-Arginin	20 mg
L-Phenylalanin	10 mg
L-Asparaginsäure	10 mg
Tween 80	0,1 mg
LDH	(150 U <sup>25 °C</sup> ) 0,5 mg

Der pH-Wert der Lösung wird mit H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> auf pH 7,4 eingestellt.

2 g L-Arginin, 1 g Asparaginsäure und 1 g L-Phenylalanin wurden in 70 ml Wasser gelöst und 20 min. gerührt. Anschließend wurde der pH durch Zugabe von Phosphorsäure auf 7,4 eingestellt. Zu dieser Lösung wurden 50 mg (15 kU) LDH (aus Schweinemuskel, gelöst in 30 ml 100 mM Phosphat-Puffer) zupipettiert und 5 min. gerührt. Der pH wurde kontrolliert und das Volumen auf 100 ml aufgefüllt. Von dieser Lösung wurde nach Abfüllung in Vials ein Lyophilisat wie unter Beispiel 1 hergestellt. Die Analyse ergab, daß ein Teil des Phenylalanins in kristalliner Form vorliegt, der Kuchen also teilweise kristallin, teilweise amorph ist. Während der Lagerung blieb der kristalline Anteil konstant.

#### Beispiel 5

Von den Rezepturen 1 und 2 wurde nach Lagerung der Vials bei RT der Gehalt an unverändertem G-CSF mit RP-HPLC bestimmt:

	Anteil unverändertes Protein nach 4 Wochen RT
Bulk-Wirkstoff ohne Zusatz von Hilfsstoffen, lyophil.	96,5%
L-Arginin/Phosphat/Tween 80 (Rez. 1)	98,9%
L-Valin/Glycin/Tween (Rez. 2)	92,0%

Von den Rezepturen 3 und 4 wurde nach Lagerung der Vials bei RT (nach 5 bzw. 13 Wochen) die enzymatische Aktivität im gekoppelten optischen Test bestimmt:

	nach Lyo.	5 Wochen RT	13 Wochen RT
Bulk-Wirkstoff ohne Zusatz von Hilfsstoffen, lyophil.	61,3 %	29,1 %	11,4 %
L-Arginin/Phosphat/L-Phenylalanin (Rez. 4)	81,2 %	74,3 %	58,1 %
L-Valin/Glycin/ (Rez. 3)	64,1 %	9,2 %	< 1 %

Analog zu Rezeptur 4 wurden Lyophilisate hergestellt. Arginin wurde jedoch durch dieselbe molare Menge anderer basischer Aminosäuren ersetzt. Es wurde die Enzymaktivität von LDH im Lyophilisat nach 5 Wochen nach Lagerung bei Raumtemperatur (RT) bestimmt:

	No.	nach Lyo.	5 Wochen RT
<b>L-Citrullin</b>	<b>Rez. 5</b>	<b>82,2%</b>	<b>60,4%</b>
<b>L-Histidin</b>	<b>Rez. 6</b>	<b>65,5%</b>	<b>53,1%</b>
<b>L-Lysin</b>	<b>Rez. 7</b>	<b>68,6%</b>	<b>56,5%</b>
<b>L-Ornithin</b>	<b>Rez. 8</b>	<b>65,5%</b>	<b>46,5%</b>

## Beispiel 7

Rezeptur	Konzentration der Ausgangslösung
L-Arginin	20 mg/ml
L-Isoleucin	10 mg/ml
rhNGF	10 µg

Der pH-Wert der Lösung wird mit Säure pH 6,3 eingestellt.

Jeweils 2 g L-Arginin wurden in 50 ml Wasser gelöst und durch Zugabe einer Säure ein pH von 6,3 eingestellt. 1 g Isoleucin sowie 1 mg rhNGF wurden zugegeben und mit Wasser auf ein Volumen von 100 ml aufgefüllt. Diese Lösung wurde membranfiltriert (PVDF-Filter 0,2 µm) und jeweils 1 ml in Glasvials abgefüllt. Nach Aufsetzen eines geeigneten Stopfens wurde eine Gefriertrocknung nach einer Gesamttrocknungszeit von etwa 40 Stunden durchgeführt. Die Lyophilisate wurden anschließend mit DSC vermessen.

## Ergebnis

zur pH-Einstellung eingesetzte Säure	No.	Tg	Bewertung
HCl	Rez. 9	41,4 °C	-
L-Milchsäure	Rez. 10	54,3 °C	(+)
3-Hydroxybuttersäure	Rez. 11	37,7 °C	--
Äpfelsäure	Rez. 12	67,8 °C	+
Bernsteinsäure	Rez. 13	76,1 °C	+
Fumarsäure	Rez. 14	81,0 °C	++
Maleinsäure	Rez. 15	82,3 °C	++
L-Glutaminsäure	Rez. 16	86,1 °C	++

## Beispiel 8

Nach dem Verfahren aus Beispiel 7 wurden Lyophilisate mit dem Wirkstoff Ularitide hergestellt mit folgender Zusammensetzung pro vial:

- a) Rezeptur 17 (Vergleichsbeispiel)  
1 mg Ularitide  
10 mg Mannit

mit Essigsäure ad pH 6.

Nach Analyse im Röntgenbeugungsmuster zeigt sich, daß das Lyophilisat eine vollkristalline Struktur aufweist. Es sind keine amorphen oder teilmorphe Strukturen nachweisbar.

b) Rezeptur 18

1 mg Ularitide

20 mg L-Arginin

10 mg L-Isoleucin

mit Asparaginsäure ad pH 6,3

Bewertung im DSC:

Rezeptur 17: kein Glasübergang erkennbar, ist vollkristallin

Rezeptur 18: Tg=85,1°C.

Beide Rezepturen 17 und 18 wurden 1 Jahr bei Raumtemperatur gelagert. Die anschließende Gelelektrophorese ergab folgende Resultate:

Rez. 17: Dimere > 1% und lösliche Aggregate

Rez. 18: 100% Monomer; teilmorphe Struktur

#### Beispiel 9

Nach dem Verfahren aus Beispiel 7 wurden Lyophilisate nach den folgenden Rezepturzusammensetzungen No. 19–23 mit dem Wirkstoff Ularitide folgende Zusammensetzung pro vial hergestellt:

a) Rez. 19 (Vergleichsbeispiel)

1 mg Ularitide

50 mg Saccharose

10 mg Glycin

6 mg Polyethylenglycol 6000.

Mittels DSC-Verfahren konnte keine Glasübergangstemperatur bestimmt werden. Das Lyophilisat ist vollständig kristallin ohne erkennbar amorphe oder teilmorphe Anteile.

b) Rez. 20

1 mg Ularitide

20 mg L-Arginin

10 mg L-Isoleucin

mit Asparaginsäure ad pH 6,3

c) Rez. 21

4 mg Ularitide

20 mg L-Arginin

10 mg L-Isoleucin

mit Asparaginsäure ad pH 6,3

d) Rez. 22

1 mg Ularitide

20 mg L-Arginin

10 mg L-Leucin

mit Asparaginsäure ad pH 6,3

e) Rez. 23 (Vergleichsbeispiel)

1 mg Ularitide

25 mg Saccharose

20 mg Glycin.

Alle Rezepturen 19–23 wurden in einem Belastungstest bei unterschiedlichen Temperaturen gelagert und anschließend mit RP-HPLC der Gehalt bestimmt.

	Startwert	13 Wo. 5°C	13 Wo. 25°C	13 Wo. 40°C
<u>Rez. 19</u>	99,3 %	99,1 %	98,8 %	96,3 %
<u>Rez. 20</u>	99,7 %	99,3 %	99,7 %	99,6 %
<u>Rez. 21</u>	99,6 %	99,6 %	99,5 %	99,2 %
<u>Rez. 22</u>	99,7 %	99,5 %	99,2 %	99,4 %
<u>Rez. 23</u>	99,4 %	99,5 %	98,2 %	93,1%

Nach dem Verfahren aus Beispiel 8 wurden Lyophilisate mit dem Wirkstoff Ularitide hergestellt mit folgender Zusammensetzung pro vial:

- 5 a) Rez. 24 (Vergleichsbeispiel)  
 1 mg Ularitide  
 15 mg Glycin  
 2 mg L-Isoleucin  
 10 mg Harnstoff  
 0,5 mg Polysorbat  
 mit Na-Acetat-Puffer ad pH 6,8; vollständig kristallin.  
 b) Rez. 25  
 1 mg Ularitide  
 20 mg D-Arginin  
 10 mg D-Isoleucin  
 mit D-Asparaginsäure ad pH 6,8  
 c) Rez. 26  
 1 mg Ularitide  
 20 mg L-Arginin  
 10 mg L-Isoleucin  
 mit L-Asparaginsäure ad pH 6,8  
 d) Rez. 27  
 1 mg Ularitide  
 20 mg L-Threonin  
 10 mg L-Isoleucin  
 e) Rez. 28 (Vergleichsbeispiel)  
 1 mg Ularitide  
 15 mg Polyethylenglykol 6000  
 5 mg Phenylalanin.

Die Rezepturen wurden in einem Belastungstest bei unterschiedlichen Temperaturen gelagert und anschließend mit RP-HPLC die Menge des Hauptabbauprodukts bestimmt ('Peak X1):

	Startwert	13 Wo. 5°C	13 Wo. 40°C	Tg
<u>Rez. 24</u>	0,2 %	2,1 %	6,5 %	-
<u>Rez. 25</u>	0,4 %	0,4 %	0,5 %	83,8°C
<u>Rez. 26</u>	0,2 %	0,2 %	0,4 %	84,6°C
<u>Rez. 27</u>	0,3 %	1,8 %	3,5 %	61,2°C
<u>Rez. 28</u>	0,3 %	2,8 %	4,7 %	-

## Beispiel 11

Nach dem Verfahren aus Beispiel 7 wurden Lyophilisate mit dem Wirkstoff Ularitide hergestellt mit folgender Zusammensetzung pro vial:

- 55 a) Rez. 29  
 1 mg Ularitide  
 70 mg Saccharose  
 10 mg L-Phenylalanin  
 b) Rez. 30  
 1 mg Ularitide  
 85 mg Saccharose  
 c) Rez. 31  
 1 mg Ularitide  
 46 mg Raffinose  
 10 mg L-Phenylalanin  
 d) Rez. 32  
 1 mg Ularitide  
 20 mg L-Arginin



5 mg L-Phenylalanin  
mit L-Asparaginsäure ad pH 6,3.

Alle Rezepturen 29–32 wurden in einem Belastungstest bei unterschiedlichen Temperaturen gelagert, anschließend das Lyophilisat in jeweils 1 ml Wasser gelöst und die Trübung der rekonstituierten Lösung nach 1 Std. in einem Nephelometer (Marke Hach) bestimmt. Trübungswerte über 1,0 gelten als bedenklich. Da die Hilfsstoffe gut löslich sind, ist die Ursache für die in einigen Rezepturen beobachtete Eintrübung eine Aggregation des Peptids.

#### Ergebnisse

Rez. Nr.	Startwert	4 Wo. KS	4 Wo. RT	4 Wo. 40 °C	13 Wo. KS	13 Wo. RT	13 Wo. 40 °C
19	0,6	0,8	0,5	1,6	0,8	1,4	3,6
23	0,7	0,5	0,4	1,2	0,8	0,9	1,4
29	0,7	0,7	0,6	0,6	1,4	1,7	1,7
320	0,8	0,7	1,1	1,0	1,7	1,9	1,7
31	1,4	1,2	1,1	1,4	n.d.	n.d.	n.d.
32	0,6	0,5	0,7	0,6	0,5	0,5	0,5
20	0,5	0,6	0,6	0,7	0,6	0,7	0,8

#### Beispiel 12

Ularitide wurde in verschiedene Rezepturen nach Lagerung wie in Beispiel 11 rekonstituiert und die Lösung nach 3 Stunden mit einem Lichtstreuemeßgerät (PMS) auf Partikel hin untersucht.

Ergebnisse: (angegeben sind jeweils Mittelwerte aus der Zählung von 5 vials)

Rez. Nr.	Startwert		4 Wo. KS		4 Wo. 40 °C		13 Wo. KS		13 Wo. 40 °C	
	>5 µm	>25 µm	>5 µm	>25 µm	>5 µm	>25 µm	>5 µm	>25 µm	>5 µm	>25 µm
25	78	4	140	21	1262	28	713	28	2560	35
31	36	2	160	6	849	17	440	11	1389	22
34	4	0	6	0	21	4	31	1	65	11
22	11	0	13	1	34	3	17	0	42	7

#### Beispiel 13 (Vergleichsbeispiel)

Rezeptur 33                      Konzentration der Ausgangslösung  
L-Arginin                      20 mg/ml  
Ularitide                      1,0 mg/ml

Der pH-Wert der Lösung wird mit H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> auf pH 6,0 eingestellt.

2 g L-Arginin und 1 g L-Aspartat wurden in 50 ml Wasser gelöst und durch Zugabe von Phosphorsäure ein pH von 6,0 eingestellt. Zu dieser Lösung wurden 100 mg Ularitide (gelöst in 30 ml H<sub>2</sub>O) zupipettiert und 10 min. gerührt. Nach 60 Minuten wurde die Lösung trüb und das Protein flockte aus. Der Versuch wurde daraufhin abgebrochen.

#### Patentansprüche

1. Lyophilisierte Zubereitungen enthaltend
  - a) Biomoleküle ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Proteinen, Peptiden, Nukleinsäuren und Kohlehydraten,
  - b) eine oder mehrere basische D- oder L-Aminosäure und

c) eine oder mehrere Aminodicarbonsäure, Hydroxycarbonsäure, Hydroxydicarbonsäure oder Dicarbonsäure, oder deren physiologisch verträgliche Salze, wobei die Hilfsstoffe im Lyophilisat zumindest teilweise in amorpher Form vorliegen.

2. Lyophilisierte Zubereitungen gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Gewichtsverhältnis der in c) genannten Zusatzstoffe zu den in b) genannten Zusatzstoffen im Bereich von 0,1 : 1 liegt.

3. Lyophilisierte Zubereitungen nach einem der Ansprüche 1-2, dadurch gekennzeichnet, daß sie als Hilfsstoffe Polymere (Verbindungen mit einem Molekulargewicht > 1000) in einer Menge von weniger als 10 Gew.-% der gesamten Hilfsstoffmasse enthalten.

4. Lyophilisierte Zubereitungen nach einem der Ansprüche 1-3, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Glasübergangstemperatur von > 50°C aufweisen.

5. Lyophilisierte Zubereitungen nach einem der Ansprüche 1-4, dadurch gekennzeichnet, daß die gefrorene Lösung vor der Lyophilisation eine Glasübergangstemperatur von mehr als -40°C aufweisen.

6. Lyophilisierte Zubereitung nach einem der Ansprüche 1-5, dadurch gekennzeichnet, daß die saure Aminosäure Asparaginsäure oder Glutaminsäure ist.

7. Lyophilisierte Zubereitungen nach einem der Ansprüche 1-6, dadurch gekennzeichnet, daß sie zusätzlich eine oder mehrere Aminosäuren mit hydrophobem Rest enthalten.

8. Lyophilisierte Zubereitungen nach Anspruch 7 enthaltend Leucin, Isoleucin, Valin oder Phenylalanin, insbesondere Isoleucin oder Phenylalanin.

9. Lyophilisierte Zubereitungen nach einem der Ansprüche 1-9, dadurch gekennzeichnet, daß die mit Wasser rekonstituierte Lösung einen pH-Wert zwischen etwa 3 und 9 aufweisen.

10. Lyophilisierte Zubereitungen nach einem der Ansprüche 1-9, dadurch gekennzeichnet, daß das Massenverhältnis Wirkstoff zu Hilfsstoff kleiner als 1 : 10 ist.

11. Lyophilisierte Zubereitung gemäß einem der Ansprüche 1-10, dadurch gekennzeichnet, daß das Biomolekül ein Peptid aus der Klasse der Atrialen Natriuretischen Peptide ist.

12. Verfahren zur Herstellung von lyophilisierten Zubereitungen nach einem der Ansprüche 1-11, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Lösung oder Suspension des Biomoleküls in einem physiologisch verträglichen Lösungsmittel herstellt und a) eine oder mehrere basische D- oder L-Aminosäuren; und b) mindestens eine oder mehrere Aminodicarbonsäuren oder organische oder anorganische Säuren hinzufügt; und anschließend die Lösung lyophilisiert.